



KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

## KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020020025346 A  
 (43)Date of publication of application:  
 04.04.2002

(21)Application number: 1020000057071  
 (22)Date of filing: 28.09.2000

(71)Applicant: HANBUL COSMETICS CO., LTD.

(72)Inventor: CHO, YEONG HO  
 HONG, SEUNG GUK  
 KIM, JIN HWA  
 LEE, CHUNG U  
 LEE, JEONG JAE  
 PARK, SEONG MIN  
 PYO, HYEONG BAE

(51)Int. Cl. A61K 7/40

(54) EXTRACTS OF ANGELICA DAHURICA AND ANGELICA TENUSSIMA AND COSMETIC COMPOSITION THE SAME

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided are method for extracting and purifying active ingredients from Angelica dahurica and Angelica tenuissima, and a cosmetic composition containing the active ingredients. CONSTITUTION: The functional cosmetic composition is manufactured by using isolimperatorin, imperatorin and ligustilide which are active ingredients of and included in the extract of Angelica dahurica and Angelica tenuissima obtained by using a solvent containing 40-95 wt.% of ethanol, wherein the ethanol extract is excellent in whitening skin, decreasing skin stimulation and increasing immunity.

copyright KIPO 2002

## Legal Status

Date of request for an examination (20000928)

Notification date of refusal decision (00000000)

Final disposal of an application (registration)

Date of final disposal of an application (20021022)

Patent registration number (1003615920000)

Date of registration (20021106)

Number of opposition against the grant of a patent ( )

Date of opposition against the grant of a patent (00000000)

Number of trial against decision to refuse ( )

Date of requesting trial against decision to refuse ( )

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) . Int. Cl. 7  
A61K 7/40  
A61K 7/48

(45) 공고일자 2002년11월22일  
(11) 등록번호 10-0361592  
(24) 등록일자 2002년11월06일

(21) 출원번호 10-2000-0057071  
(22) 출원일자 2000년09월28일

(65) 공개번호 특2002-0025346  
(43) 공개일자 2002년04월04일

(73) 특허권자 한불화장품주식회사  
서울 강남구 역삼1동 642

(72) 발명자 표형배  
충청북도청주시흥덕구개신동447-15두산한솔아파트101동208호  
이충우  
충청북도청주시흥덕구가정동1516번지태암수경아파트101동1508호  
박성민  
충청북도청주시흥덕구북대1동삼일아파트103동601호  
조영호  
충청북도청주시흥덕구분평동분평주공아파트203동1905호  
김진화  
충청북도청주시흥덕구가정동세원3차아파트102-1202호  
이정재  
충청북도음성군금왕읍무극리두진백로아파트101-1102  
홍승국  
경기도안양시만안구안양6동590-23삼화빌라202호

(74) 대리인 한양특허법인

심사관 : 이영완

(54) 백지, 고본 추출물 및 이 추출물을 함유하는 화장료 조성물

요약

본 발명은 백지, 고본으로부터 유효 활성성분을 추출·정제하는 방법과 그 유효활성성분을 함유하는 피부 화장료에 관한 것이다.

본 발명에 의하면 이들 원료들로부터 얻은 에탄올 추출물이 탁월한 피부 미백효과, 피부자극 완화효과 및 면역증강효과를 가지고, 특히 이들 원료가 함유하는 유효활성물질은 이소임페라토린(isoimperatorin), 임페라토린(imperatorin) 및 리구스틸라이드(ligustilide)이며, 이들 물질들을 이용하여 피부 미백 등 각종 기능성 화장료를 제조할 수 있다.

## 명세서

## 발명의 상세한 설명

## 발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 백지, 고본으로부터 유효 활성성분을 추출·정제하는 방법과 그 추출물 또는 이로부터 분리된 유효활성성분을 함유하는 피부화장료에 관한 것이다.

최근 피부 자극을 줄이기 위해 천연물을 사용한 화장품이 많이 개발되고 있다. 각종 한방 원료를 소정의 방법으로 추출하고, 그 추출물의 기능을 확인하여 각종 기능성 화장품을 개발하는 사례도 늘고 있다.

예를 들면 녹두는 피부를 청결하게 하는 기능이 알려져 있고, 그 인삼추출물, 삼황버섯 추출물 등에 대해서도 그 특유의 노화방지 또는 미백 등의 효과가 밝혀져 각종 화장품에 응용되고 있는 실정이다.

이러한 천연 재료는 피부에 부작용이 적을 뿐 아니라, 최근 천연 재료를 이용한 화장품에 대한 소비자들의 호응이 높아짐에 따라 화장품 원료로서 개발 가치가 한층 늘어나고 있다.

이에, 본 발명자들은 이제까지 알려지지 않은 다른 한방재료들에 있어서 화장품으로의 응용가능성을 연구한 결과, 백지 및 고본의 추출물이 추출방법에 따라 미백효과 등과 같은 화장품으로서의 효능이 기대이상으로 커질 수 있다는 것을 발견하게 되었다.

백지는 한국, 중국, 일본 등에서 자생하는 2-3년생 초본으로 높이가 1-2m이고 밑부분의 지름은 7-8cm이며 윗부분에 잔털이 있고 가지가 갈라져서 뿌리가 굵다. 근생엽(根生葉)과 밑부분의 잎은 엽병(葉柄)이 길고 3개씩 2-3회 우상(羽狀)으로 갈라지며 정소엽(頂小葉)은 밑으로 호르고 다시 3개로 갈라진다. 소엽(小葉)과 열편은 긴 타원형 또는 좁은 난상 긴 타원형이며 길이 5-10cm, 너비 2-5cm이며 예두(銳頭) 또는 점첨두(漸尖頭)이고 가장자리에 규칙적이고 예리한 톱니가 있으며 표면은 맥(脈)위가 때로 거칠어지고 뒷면은 흰빛이 돌며 때로 백색과 가장자리에 잔털이 있고 윗부분의 잎은 작고 엽초는 굵어져서 도란형 또는 긴 타원형으로 된다. 6-8월에 꽃이 피고 꽃은 백색이며 큰 산형화서(傘形花序)에 달리고 소화경(小花梗)은 20-40개이며 길이 4-6cm이고 소화경과 더불어 잔털기가 백색이나며 총포(總苞)는 있고 소총포(小總苞)는 작다. 10월에 열매가 성숙되며 분과(果分)는 편평한 타원형이고 기부(莖部)가 들어가며 길이 8-9cm이고 뒷면의 능선(稜線)이 역처럼 가늘고 가장자리의 것은 날개 모양이며 능선 사이에 1-2개 합생면(合生面)에 2-4개의 유관(油管)이 있다. 구멍대 및 그 변종(ミナリ과 Umbelliferae)의 뿌리를 백지(白芷)라 한다. 백지의 학명은 *Angelica dahurica* BENTHAM et HOOKER이고, 속명은 여러가지가 있으며 대활(大活), 황대활(香大活), 흥안백지(興安白芷), 독활(獨活), 지(芷), 토백지(土白芷), 주마근(走馬芹), 주마근종자(走馬芹種子), 구리대, 곰배지, 구리때로도 불리고 있다(김택형, 한국의 자원식물Ⅲ, 서울대학교 출판부, 1996).

백지의 성상은 짧은 주근에서 많은 긴 뿌리가 갈라져서 대개 방추형을 이루고, 길이 10-25cm, 바깥면은 회갈색 - 암갈색, 근두부(根頭部)에는 약간의 엽초가 남아 있고 백백하게 융기한 돌림마디가 있다. 뿌리에는 세로 주름 및 가로로 융기한 많고 가는 뿌리의 흔적이 있다. 특이한 냄새가 있고 약간 고미이다. 횡단면의 주변은 회백색으로 빈틈이 많고 중앙부는 암갈색으로 성분은 백안겔리온, 백안겔리롤, 임페라토린, 크산토독신, 펠로스테린, 스코폴렌린, 마세린 등이 있다(한대석, 생약학, 동명사, 1996).

백지의 효능은 예로부터 여러 가지가 알려져 있는데 특히 거풍습(??風濕), 활혈배농(活血排膿), 생기정통(生肌止痛), 아통(牙痛), 잇몸출혈 때, 장풍치루(腸風痔漏), 적백대하증, 피부소양증, 용저창양(癰疽瘡瘍), 두통, 긴장, 진풍, 지혈, 정혈, 안면신경통, 항균 등에 효과가 있다.

고본은 한국의 여러곳에서 자라는 다년초로 높이는 60cm정도이다. 잎은 어긋나며, 근생엽(根生葉)은 엽병(葉柄)이 길고 경엽(莖葉)은 엽초가 있고 3회 우상(羽狀)으로 전열(全裂)하며 열편은 선형이다. 꽃은 백색으로 8-9월에 피며 복산형화서이고, 총산경(總梗)은 10개이며 소산경은 다수이다. 1개의 총포편(總苞片)은 넓고 크며, 작은 총포편은 다수로서 선형이고 좌편은 소형이다. 꽃잎은 5개이며 안으로 굽고 5개의 수술은 길게 나오며 1개의 씨방이 있다. 과실은 타원형이고 날개가 있다. 뿌리를 고본(藥本)이라 한다. 고본의 학명은 *Angelica tenuissima* NAKAI이고, 속명은 여러 가지가 있으며 돌반향, 산파향, 고발, 미경으로도 불리고 있으며 성분은 센카놀리드, 부틸리넨프탈리드 등을 주로한 정유와 부틸리넨 프탈리드, 크니딜리드 등이 있다 (육창주, 한국약용식물도감, 아카데미서적, 1993, 한대식, 생약학, 동명사, 1996).

고본의 효능은 예로부터 여러 가지가 알려져 있는데 특히 두통(頭痛), 신통(身疼), 오한발열, 지절통(肢節疼), 진통, 항인플루엔자 바이러스 작용, 거풍지통(祛風止痛)작용, 피부병 치료 등에 효과가 있다.

이러한 백지 및 고본을 화장품으로 응용한 예가 국내 특허출원 98-49138호에 개시되어 있다. 그러나, 이 출원에 개시된 추출물은 백지, 고본 외에, 천궁, 살구씨, 황금, 당귀, 녹두, 삼백초, 인삼잎, 부자, 두충, 방풍, 표고버섯, 백령 등을 적당한 배율로 배합하여 1,3부틸렌글리콜에 의해 추출한 것으로서, 이미 녹두나 살구씨 같은 미백효과 등의 기능이 잘 알려진 원료가 같이 포함되어 있어, 백지, 고본 만을 따로 추출한 추출물의 효능에 대해서는 알 수 없다. 또, 백지의 경우 그 성분이 이미 알려져 있기는 하나, 그 각각의 성분이 가지는 기능에 대해서는 알려져 있지 않고, 이는 고본의 경우도 마찬가지이다.

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에 본 발명자들은 한방 원료 중 백지 및 고본을 선택하여, 이들의 화장품 원료로서의 효능을 확인하고 그 사용방법을 개발함으로써, 다양한 화장품의 원료의 선택범위를 넓히고, 또 이들 원료들을 사용하여 보다 자극이 없으면서도 소정의 기능성 효과를 나타내는 화장품을 제조할 수 있는 방법을 제공하고자 하였다.

또한, 백지, 고본의 추출물 제조시 특정 추출용매 선택시 목적 효능이 더욱 크게 나타난 점으로부터 화장품 원료로서의 유효활성물질이 무엇인지를 밝혀내고, 이들 물질의 분리방법, 이들 물질을 이용하여 화장료를 제조하는 방법 및 그 화장료를 제공하고자 하였다.

#### 발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 에탄올 40-95중량% 함유 수용액을 추출용매로 추출하여 얻은 것으로서 이소임페라토린과 임페라토린을 각각 0.2-0.4 중량% 포함하는 것을 특징으로 하는 백지 추출물을 제공한다.

에탄올 40-95중량% 함유 수용액을 추출용매로 추출하여 얻은 것으로서 리구스틸라이드를 0.1-0.3중량% 포함하는 것을 특징으로 하는 고본 추출물을 제공한다.

본 발명은 또한, (1) 백지를 70-85℃에서 에탄올 40-95중량% 함유 수용액으로 추출하는 단계와, (2)상기 추출단계에서 얻어진 여액을 50℃이하에서 감압농축하는 단계와, (3) 클로로포름과 메탄올(중량%비율 - 50:1 내지 1:1)을 이등상으로 하는 230-400메시의 실리카겔 칼럼크로마토그래피에 의해 상기 감압농축물로부터 유효성분인 이소임페라토린과 임페라토린을 함유하는 에탄올 추출물을 분리·정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 백지 추출물 제조방법을 제공한다.

본 발명은 또한, (1) 고본을 70-85℃에서 에탄올 40-95중량% 함유 수용액으로 추출하는 단계와, (2) 상기 추출단계에서 얻어진 여액을 50℃이하에서 감압농축하는 단계와, (3) 핵산과 에틸아세테이트(중량%비율 5:1 내지 1:1)를 이동상으로 하는 230-400메쉬의 실리카겔 칼럼크로마토그래피에 의해 상기 감압농축물로부터 유효성분인 리구스틸라이드를 함유하는 에탄올 추출물을 분리 정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 고본 추출물 제조방법을 제공한다.

본 발명은 상기 추출물을 피막 형성제와 혼합하여 스프레이 드라이로 파우더화한 것을 특징으로 하는 백지 또는 고본 추출물 파우더를 제공한다.

본 발명은 또한, 이소임페라토린, 임페라토린 또는 리구스틸라이드들 유효성분으로 하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물을 제공한다.

상기 화장품 조성물은 피부 미백용으로 사용되는 것을 특징으로 한다.

상기 화장품 조성물은 피부 자극완화용으로 사용되는 것을 특징으로 한다.

상기 화장품 조성물은 피부 면역증강용으로 사용되는 것을 특징으로 한다.

상기 유효성분들은 상기의 추출물의 형태 또는 파우더 형태로 함유된다.

이하, 실시예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 단, 이들 실시예는 본 발명의 예시적인 기재일 뿐이며 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

#### [실시예 1]

세절하여 용긴한 백지 450g을 뜨거운(hot) 95%(V/V) 에탄올 수용액으로 5시간씩 3회 환류추출하고 냉침한 후, 왓만(Whatman) #5 여과지로 여과하였다. 여과된 추출물을 50℃이하에서 감압농축한 후 75.8g의 에탄올 추출물을 얻었다. 감압농축액을 230-400메쉬의 실리카겔 칼럼크로마토그래피에 의해 클로로포름과 메탄올(중량%비율 - 50:1 내지 1:1)을 이동상으로 용출시켜 유효 활성성분(isoimperatorin, imperatorin)을 분리 정제하여 이 유효 활성성분들을 각각 0.2-0.4중량% 함유하는 에탄올 추출액을 피막 형성제인 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 결정성셀룰로스, 히드록시프로필셀룰로스, 폴리비닐알콜, 폴리비닐피롤리돈, 수크로스, 락토오스, 글루코오스, 갈락토스, HP-β-시클로덱스트린 등과 혼합하여 스프레이 드라이어로 파우더화 하였다.

#### [실시예 2]

세절하여 용긴한 고본 750g을 뜨거운(hot) 95%(V/V) 에탄올 수용액으로 5시간씩 3회 환류추출하고 냉침한 후, 왓만(Whatman) #5 여과지로 여과하였다. 여과된 추출물을 50℃이하에서 감압농축한 후 117g의 에탄올 추출물을 얻었다. 감압농축액을 230-400메쉬(mesh)의 실리카겔 칼럼크로마토그래피에 의해 핵산과 에틸아세테이트(중량%비율 - 5:1 내지 1:1)을 이동상으로 용출시켜 유효 활성성분(figustilide)을 분리 정제하여 이 유효 활성성분들을 0.1-0.3중량% 함유하는 에탄올 추출액을 피막 형성제인 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 결정성셀룰로스, 히드록시프로필셀룰로스, 폴리비닐알콜, 폴리비닐피롤리돈, 수크로스, 락토오스, 글루코오스, 갈락토스, HP-β-시클로덱스트린 등과 혼합하여 스프레이 드라이어로 파우더화 하였다.

[실시예 3]

본 실시예는 실시예 1 내지 2에서 수득한 활성성분인 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지, 고본 추출물 파우더의 미백효과를 확인하기 위해 델라노사이트 자극 호르몬(MSH)를 이용하여 델라노사이트의 멜라닌 합성 저해경도로 미백효과를 평가한 것이다.

본 실시예에 사용된 A375SM 델라노사이트는 사람에서 유래한 세포주이며 정상적인 조건에서는 멜라닌이라는 흑색 색소를 분비하지 않으나 델라노사이트 자극 호르몬(MSH)을 처리하면 멜라닌을 분비하는 세포이다. 이 세포의 인공배양중에  $\alpha$  - MSH와 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지, 고본 추출물 파우더를 동시에 처리하여 멜라닌 흑색색소의 합성 정도를 비교평가하였다. 본 실시예에 사용된 A375SM 델라노사이트는 KCLB(Korea Cell Line Bank, 기탁번호:80004)로부터 분양받아 사용하였다.

델라노사이트 자극 호르몬은 델라노사이트의 세포막 수용체와 결합하여 세포내로 멜라닌 합성 신호를 전달하는 사이토킨으로  $\alpha$  - type과  $\beta$  - type으로 나누어지는데,  $\beta$  - type은 동물개체간 특이성이 높아 사람과 마우스 등 동물개체간 교차반응이 일어나지 않고,  $\alpha$  - type은 모든 동물개체간 동일한 구조를 가지고 있어 실험실내 미백효과 평가를 위하여 폭넓게 사용되고 있다.

$\alpha$  - MSH를 이용한 A375SM 델라노사이트의 멜라닌 합성 억제효과 측정은 다음과 같이 행하였다.

A375SM 델라노사이트를 6 웰 플레이트에 각 웰당  $2 \times 10^6$  농도로 분주하고 세포를 부착시킨 후  $\alpha$  - MSH(Sigma사) 200nM과 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지와 고본 추출물 파우더를 독성을 유발하지 않는 농도로 동시에 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 48시간 배양 후 세포를 trypsin-EDTA로 떼어낸 후 세포수를 측정한다. 다음 원심분리하여 세포를 회수하였다. 세포내 멜라닌 정량은 로탄(Lotan : Cancer Res., 40:3345-3350, 1980)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 셀 펠렛을 PBS로 1회 세척한 후 균질화 버퍼액(homogenization buffer(50mM 소듐 포스페이트, pH6.8, 1% Triton X-100, 2mM PMSF)) 1mL을 첨가하여 5분간 와류(vortexing)하여 세포를 파쇄하였다. 원심분리(3,000rpm,10분)하여 얻은 세포 여액(cell lysate)에 1N NaOH(10% DMSO)를 첨가하여 추출된 멜라닌을 용해한 후 마이크로플레이트 판독기(microplate reader, ELx800, 미국)로 405nm에서 멜라닌의 흡광도를 측정하여 합성된 멜라닌을 정량한 다음 시료의 멜라닌 합성 저해율(%)을 측정하였다. A375SM 델라노사이트의 멜라닌 합성 저해율(%)은 다음식에 의하여 계산하였으며, IC<sub>50</sub> 값은 델라노사이트의 세포막에 결합하는  $\alpha$  - MSH를 저해하여 멜라닌 생성을 50% 저해하는 물질의 농도이다.

저해율(%) =  $[(A - B)/A] \times 100$

A :  $\alpha$  - MSH만 첨가한 웰의 멜라닌 양

B : 시료와  $\alpha$  - MSH를 동시에 첨가한 웰의 멜라닌 양

$\alpha$  - MSH를 이용한 A375SM 델라노사이트의 멜라닌 생성 억제 효과를 시험한 결과 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지와 고본 추출물 파우더의 IC<sub>50</sub> 값은 0.01% - 0.03%로 나타나 기존의 미백제인 코지산, 알부틴, 유용성 감초 추출물, 상백피 추출물 등에 비해 우수한 효과를 나타내었다(표 1). 이와같은 결과로 볼 때 본 발명의 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지, 고본 추출물 파우더의 경우 기존의 미백제가 단순히 티로시나제만을 저해하는 것과는 달리 델라노사이트 자극 호르몬인  $\alpha$  - MSH가 델라노사이트에 결합하는 것을 저해하여 멜라닌 합성을 저해하는 것임을 알 수 있다.

[표 1]

시료	멜라닌 합성 저해 효과(IC <sub>50</sub> )
코지산	0
알부민	0
백지 추출물 파우더	0.01%
고본 추출물 파우더	0.01%
이소임페라토린	0.02%
임페라토린	0.03%
리구스틸라이드	0.02%
상백피 추출물	0
유효성 감초추출물	0

[실시예 4]

본 실시예는 실시예 1 내지 2에서 수득한 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지, 고본 추출물 파우더의 미백효과를 확인하기 위해 티로시나제(tyrosinase)라는 효소의 기능이 억제되는 정도를 보고 미백효과를 판단한 것이다.

티로시나제는 생체내에서 티로신(tyrosine)이라는 물질의 산화과정을 촉진하여 멜라닌이 생성되게 도와주는 효소이다. 본 실시예에서는 이 효소의 기능을 억제하여 티로신이 산화되어 멜라닌이라는 흑색의 고분자를 형성하는 것을 억제하는 정도를 측정하는 방법(Pomerantz S.H., J. Biochem., 24:161 - 168, 1966)을 응용해 미백효과를 판정하였다.

상백피 추출물, 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드, 백지 추출물 파우더, 고본 추출물 파우더, 코지산, 알부민, 유효성 감초추출물을 시료로 사용하여 티로시나제 활성 억제효과를 조사하였다.

각 시료들의 티로시나제에 대한 저해활성은 시료 15 $\mu$ l를 96 웰 플레이트에 넣고, 50mM 인산완충액(pH6.5) 150 $\mu$ l, 1.5mM L-티로신 용액 25 $\mu$ l를 넣은 후, 머쉬룸 티로시나제(1,500units/ml, Sigma社) 10 $\mu$ l를 첨가하여 37℃에서 20분간 반응시킨후 마이크로플레이트 판독기(microplate reader, ELx800, 미국)를 사용하여 490nm에서 흡광도를 측정하여 티로시나제에 대한 저해율을 측정하였다. 티로시나제에 대한 저해율(%)은 다음식에 의하여 계산하였으며, IC<sub>50</sub> 값은 티로시나제 효소 활성을 50% 저해하는 물질의 농도이다.

$$\text{저해율(\%)} = \{(D - C) - (B - A)/(D - C)\} \times 100$$

A : 시료를 넣은 웰의 반응전 흡광도

B : 시료를 넣은 웰의 반응후 흡광도

C : 시료를 넣지 않은 웰의 반응전 흡광도

D : 시료를 넣지 않은 웰의 반응후 흡광도

티로시나제 활성 억제 효과를 시험한 결과 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지와 고본 추출물 파우더의 IC<sub>50</sub> 값은 0.02% - 0.025%로 나타나 티로시나제 저해효과가 뛰어나다고 알려진 기존의 미백제인 코지산, 알부민, 상백피 추출물 등에 비해 우수한 효과를 나타내었다(표 2).

[표 2]

시 료	미쉬롬 티로시나제 저해효과(IC <sub>50</sub> )
코지산	0.037%
알부틴	0.4%
백지 추출물 파우더	0.02%
고본 추출물 파우더	0.02%
이소임페라토린	0.023%
임페라토린	0.025%
리구스틸라이드	0.024%
상백피 추출물	10%
유용성 감초추출물	0.02%

[실시예 5]

본 실시예는 실시예 1 내지 2에서 수득한 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지, 고본 추출물 파우더의 미백효과를 확인하기 위해 방선균에 대한 델란닌 생성 억제 정도를 보고 미백효과를 판단한 것이다.

방선균(*Streptomyces bikiniensis* NRRL B1049)은 한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소(KCTC)로부터 분양(기탁번호:9172)받아 사용하였다.

방선균을 파파비자스(papavizas) VDYA 한천 슬렌트 배지(V-8 juice 200ml, 포도당 2g, 효모 추출물 2g, CaCO<sub>3</sub> 1g, 한천 20g, 증류수 800ml, pH7.2)에서 2주간 28℃로 배양시켜 포자를 생성시킨 후 멸균수로 포자 현탁액을 만들었다. 0.2%의 효모 추출물을 첨가한 ISP No.7 평판배지에 포자 현탁액을 0.2ml씩 도포한 후 배지표면에 시료(30μl/paper disc)를 200μl씩 적신 paper disc를 올리고 28℃에서 배양하였다. 48시간 배양한 후 생성된 델란닌 생성 저해환의 크기를 대표적 델란닌 생성 저해물질로 알려진 4-하이드록시아니올을 대조군으로 하여 측정하여 델란닌 생성 저해 여부를 관찰하였다(이충환, 산업미생물학회지, 21:139-143, 1993).

이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지와 고본 추출물 파우더의 방선균에 대한 델란닌 생성 저해환은 각각 28-30mm로 대조군인 4-하이드록시아니올이나 기존의 미백제인 코지산, 알부틴보다 우수한 델란닌 생성 저해효과를 나타내었다(표 3).



표 3

물 질	망신균 저해율 저름(mm)
4- 하이드록시아니콜	24
코지산	0
알부틴	0
하이드로퀴논	25
백지 추출물 파우더	30
고본 추출물 파우더	30
이소임페라토린	29
임페라토린	28
리구스틸라이드	29
상백피 추출물	12
유용성 감초 추출물	16
p-매독시페놀	28

[실시예 6]

본 실시예는 실시예 1 내지 2에서 수득한 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지, 고본 추출물 파우더의 미백효과를 확인하기 위해 B16F1 멜라노사이트에 대한 멜라닌 생성 억제 정도를 보고 미백효과를 판단한 것이다.

본 실시예에 사용된 B16F1 멜라노사이트는 마우스에서 유래한 세포균주이며 멜라닌이라는 흑색색소를 분비하는 세포이다. 이 세포의 인공배양중에 시료를 처리하여 멜라닌 흑색색소가 감소하는 정도를 비교평가하였다. 본 실시예에 사용된 B16F1 멜라노사이트는 ATCC(American Type Culture Collection, 기탁번호 : 6323)로부터 분양받아 사용하였다.

B16F1 멜라노사이트의 멜라닌 생합성 억제효과 측정은 다음과 같이 행하였다.

B16F1 멜라노사이트를 6 웰 플레이트에 각 웰당  $2 \times 10^6$  농도로 분주하고 세포를 부착시킨 후 독성을 유발하지 않는 농도로 시료를 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 72시간 배양 후 세포를 trypsin-EDTA로 떼어낸 후 세포수를 측정한다. 다음 원심분리하여 세포를 회수하였다. 세포내 멜라닌 정량은 Lotan(Cancer Res., 40:3345-3350, 1980)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 셀 펠릿을 PBS로 1회 세척한 후 균질화 버퍼액(50mM 소듐 포스페이트, pH6.8, 1% Triton X-100, 2mM PMSF) 1ml를 첨가하여 5분간 와류하여 세포를 파쇄하였다. 원심분리(3,000rpm, 10분)하여 얻은 세포 여액에 1N NaOH(10% DMSO)를 첨가하여 추출된 멜라닌을 용해한 후 마이크로 플레이트 판독기로 405nm에서 멜라닌의 흡광도를 측정한 다음 멜라닌을 정량하여 시료의 멜라닌 생성 저해율(%)을 측정하였다. B16F1 멜라노사이트의 멜라닌 생성 저해율(%)은 다음식에 의하여 계산하였으며, IC<sub>50</sub> 값은 멜라닌 생성을 50% 저해하는 물질의 농도이다.

$$\text{저해율}(\%) = [(A - B)/A] \times 100$$

A : 시료를 첨가하지 않은 웰의 멜라닌 양

B : 시료를 첨가한 웰의 멜라닌 양

B16F1 멜라노사이트의 멜라닌 생성 억제 효과를 시험한 결과 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지와 고본 추출물 파우더의 IC<sub>50</sub> 값은 0.01% - 0.02%로 나타나 기존의 미백제인 코지산, 알부틴, 유용성 감초 추출물, 상백피 추출물 등에 비해 우수한 효과를 나타내었다(표 4).

[표 4]

시 료	멜라닌 생성 억제효과(IC <sub>50</sub> )
코지산	0.05%
하이드로퀴논	0.03%
알부틴	0.5%
백지 추출물 파우더	0.01%
고본 추출물 파우더	0.01%
이소임페라토린	0.02%
임페라토린	0.02%
리구스틸라이드	0.02%
상백피 추출물	5%
유용성 감초추출물	0.03%

[실시예 7]

본 실시예는 실시예 1 내지 2에서 수득한 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지, 고본 추출물 파우더의 미백효과를 확인하기 위해 B16F1 멜라노사이트내 티로시나제 효소 합성 억제 정도를 세포내 티로시나제 효소합성량을 측정하여 판단한 것이다.

본 실시예에 사용된 B16F1 멜라노사이트는 마우스에서 유래한 세포균주이며 티로시나제라는 효소를 합성하는 세포이다. 이 세포의 인공배양중에 시료를 처리하고 세포에서 티로시나제를 분리하여 효소합성량을 측정하므로서 티로시나제 효소 합성 억제 정도를 비교평가하였다.

본 실시예에 사용된 B16F1 멜라노사이트는 ATCC(American Type Culture Collection, 기탁번호 : 6323)로부터 본 양받아 사용하였다.

B16F1 멜라노사이트의 티로시나제 효소 합성억제효과 측정은 다음과 같이 행하였다.

B16F1 멜라노사이트를 6 웰 플레이트에 각 웰당  $2 \times 10^5$  농도로 분주하고 세포를 부착시킨 후 독성을 유발하지 않는 농도로 시료를 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 72시간 배양 후 세포를 Trypsin-EDTA로 떼어낸 후 세포수를 측정 한 다음 원심분리하여 세포를 회수하였다. 셀 펠릿을 PBS로 1회 세척한 후 균질화 버퍼(50mM 소듐 포스페이트, pH6.8, 1% Triton X-100, 2mM PMSF) 1ml을 첨가하여 5분간 와류하여 세포를 파쇄하고, 원심분리(3,000rpm, 10분) 하 여 상등액을 회수하였다. 50mM 소듐 포스페이트 버퍼(pH6.5)에 1.5mM L-티로신, 0.06mM L-DOPA, 세포 상등액을 각각 넣고, 37℃에서 30분간 배양한 후 마이크로플레이트 판독기로 490nm에서 흡광도를 측정하여 티로시나제 효소 합성 억제효과를 측정하였다. B16F1 멜라노사이트의 티로시나제 효소 합성 억제율(%)은 다음식에 의하여 계산하였으며, IC<sub>50</sub> 값은 티로시나제 효소 합성을 50% 저해하는 물질의 농도이다.

$$\text{저해율}(\%) = [(A - B)/A] \times 100$$

A : 시료를 첨가하지 않은 웰의 티로시나제 효소 합성량

B : 시료를 첨가한 웰의 티로시나제 효소 합성량

B16F1 멜라노사이트의 티로시나제 효소 합성 억제 효과를 시험한 결과, 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지와 고본 추출물 파우더의 IC<sub>50</sub>값은 0.015% - 0.017%로 나타나 기존의 미백제인 코지산, 알부틴, 유용성 감초 추출물, 상백피 추출물 등에 비해 매우 우수한 효과를 나타내었다(표 5). 이와같은 결과 볼 때 본 발명의 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지 추출물 파우더와 고본 추출물의 파우더의 경우는 기존의 미백제가 단순히 티

토로시나제 효소의 활성단을 저해하는 것과는 달리 토로시나제 효소의 합성을 저해하여 미백효과를 나타내는 것을 알 수 있다.

[표 1] [실시예 1] 멜라노사이트의 토로시나제 효소 합성 억제효과

시료	토로시나제 효소 합성 억제효과(IC <sub>50</sub> )
코지산	0
알부민	0
백지 추출물 파우더	0.015%
고분 추출물 파우더	0.015%
이소임페라토린	0.016%
임페라토린	0.017%
리구스틸라이드	0.016%
삼백지 추출물	0
유용성 감초추출물	0

[실시예 8]

본 실시예는 실시예 1 내지 2에서 수득한 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지, 고분 추출물 파우더의 항염증효과를 확인하기 위해 염증유발관련 효소인 히아루로니다아제의 효소 활성을 측정하여 판단한 것이다.

히아루로니다아제(Hyaluronidase)는 히아루론산을 가수분해하는 효소로 염증을 유발하는 기능을 가지고 있다. 본 실시예에서는 이 효소의 활성을 억제하여 항염증효과를 측정하는 방법(Kakegawa Y., Japanese J. of Inflammation, 4 :437-438, 1984)을 응용해 항염증효과를 판정하였다.

킵프리, 시소, 삼백초, 유용성 감초 추출물, 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드, 백지 추출물 파우더, 고분 추출물 파우더를 시료로 사용하여 히아루로니다아제 활성 억제효과를 조사하였다.

각 시료들의 히아루로니다아제 대한 저해활성은 다음과 같이 행하였다.

시료 100 $\mu$ l와 히아루로니다아제 용액 (type IV-S, Sigma사, 400U/ml) 50 $\mu$ l를 넣고 37℃에서 20분간 반응시킨후, 효소활성화용액 (Compound 48/80 CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, Sigma사, 0.1mg/ml)을 100 $\mu$ l 첨가하고 다시 37℃에서 20분간 반응시킨다. 히아루론산(hyaluronic acid) 용액 (0.4mg/ml)을 250 $\mu$ l 넣고 37℃에서 40분간 반응시키고, 0.4N NaOH 10 0 $\mu$ l를 넣어 반응을 종결시킨다. 포타슘보레이트 용액을 100 $\mu$ l 첨가하여 95℃에서 3분간 반응시키고 냉각시킨 다음 p-디메틸아미노벤즈알데히드 용액을 3ml 넣고 다시 20분간 37℃에서 반응시켜 발색시킨다. 585nm에서 흡광도를 측정하여 히아루로니다아제에 대한 저해율을 측정하였다. 히아루로니다아제에 대한 저해율(%)은 다음식에 의하여 계산하였으며, IC<sub>50</sub> 값은 히아루로니다아제 효소 활성을 50% 저해하는 물질의 농도이다.

$$\text{저해율}(\%) = [(A - B)/A] \times 100$$

A : 시료를 첨가하지 않은 웰의 효소활성

B : 시료를 첨가한 웰의 효소활성

히아루로니다아제 효소 활성 억제 효과를 시험한 결과 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지와 고분 추출물 파우더의 IC<sub>50</sub> 값은 0.05% - 0.06%로 나타나 히아루로니다아제 저해효과가 뛰어나다고 알려진 기존의 항염증제인 유용성 감초 추출물, 킵프리 추출물, 삼백초 추출물, 시소 추출물 등에 비해 우수한 효과를 나타내었다(표 6).

[표 15]

시료	히아루로니다아제 활성 억제효과(IC <sub>50</sub> )
킴프리 추출물	0.22%
사소 추출물	0.58%
유용성 갑조 추출물	0.08%
삼백초 추출물	0.3%
백지 추출물 파우더	0.05%
고본 추출물 파우더	0.05%
이소임페라토린	0.06%
임페라토린	0.06%
리구스틸라이드	0.06%

[실시예 9]

본 실시예는 실시예 1 내지 2에서 수득한 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지, 고본 추출물 파우더의 피부 면역증강작용을 평가하고자 마우스 복강내에서 활성화된 마크로파아지에 의해 생성되는 수피옥사이드 음이온의 분비정도를 정량하여 평가하였다. 면역증강작용 실험은 다음과 같이 실시하였다.

마크로파아지는 인체 면역에 담당하는 세포중의 하나로 외부 물질에 의해 자극을 받으면 수피옥사이드 음이온을 분비하여 외부 물질을 용해시키거나 세포 외부로 방출시켜 생체를 보호하게 된다. 본 면역증강작용 평가실험에는 ICR계 마우스(9주령, 수컷)를 사용하였다. 마우스의 복강으로부터 마크로파아지 세포를 회수하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양하면서 면역증강작용이 우수한 인터페론과 리포폴리사카리드(lipopoly - saccharides:LPS)를 대조군으로 하여 실시예 1 내지 2에서 수득한 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지 추출물 파우더, 고본 추출물 파우더를 각각 첨가한 후 마크로파아지 세포의 분비물 중의 수피옥사이드 음이온인 이산화질소 음이온에 대한 양을 가시광선흡수 스펙트럼으로 540nm에서 정량하였다. 그 결과 마크로파아지 세포 배양중 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지 추출물 파우더, 고본 추출물 파우더를 첨가했을 때 인터페론을 첨가한 경우보다 2배, LPS를 첨가한 경우보다 4배 정도 높은 이산화질소 음이온을 분비하는 것으로 나타나는 것으로 보아 면역증강작용이 매우 우수함을 알 수 있었다.

[실시예 10]

본 실시예는 실시예 1 내지 2에서 수득한 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지, 고본 추출물 파우더의 자극완화 효과를 평가하기 위하여 세포 배양 기술을 이용하여 피부자극을 유발하는 물질인 소듐라우릴설페이트(Sodium Lauryl Sulfate:SLS)에 의한 세포 사멸을 저해시키는 정도로 자극완화 효과를 평가한 것이다.

SLS는 화장품 기재의 피부 자극 평가의 기준이 되는 물질로 세포막에 결합되어 세포대사억제와 세포막을 파괴하여 피부 자극을 유발시키는 물질이다.

본 실시예는 사람 섬유아세포에 SLS와 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지, 고본 추출물 파우더를 동시에 첨가하였을 때 SLS에 의한 세포 사멸을 감소시키는 효과를 평가한 것이다.

본 실시예에 사용된 Hs68 섬유아세포는 사람의 피부 진피세포로 ATCC(American Type Culture Collection, 기탁번호:1635)에서 분양받아 사용하였다.

세포배양기술을 이용한 자극완화 평가 실험은 다음과 같이 행하였다.

사람 유래의 섬유아세포를 96 웰 플레이트에 각 웰당  $1 \times 10^5$  농도로 분주하고, 24시간 동안 배양한 후 0.01% SLS 단독, 0.01% SLS와 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지, 고본 추출물 파우더(0.01%)를 동시에 처리하고 24시간 동안 추가배양하였다. 배양후 MTT(Sigma사)시약을 첨가하고 4시간 동안 배양한 후, 배양액을 제거하고 1N NaOH/이소프로판올용액을 첨가하여 20분간 교반한 후 마이크로플레이트 판독기로 565nm에서 흡광도를 측정하여 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지, 고본 추출물 파우더가 SLS에 의한 세포사멸을 저해하는 효과를 측정하였다.

시험결과 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드 및 백지, 고본 추출물 파우더는 SLS에 의해서 유발되는 세포 사멸을 억제시키므로써 화장품 기재와 함께 처방하였을 때 화장품 기재로 일어날수 있는 피부 자극을 감소시키는 자극 완화 물질임이 밝혀졌다(표 7).

[표 7] 세포배양기술을 이용한 자극완화 효과

시료	섬유아세포 생존율(%)
0.01% SLS	25
0.01% SLS + 0.01% 백지 추출물 파우더	57
0.01% SLS + 0.01% 고본 추출물 파우더	52
0.01% SLS + 0.01% 이소임페라토린	56
0.01% SLS + 0.01% 임페라토린	54
0.01% SLS + 0.01% 리구스틸라이드	55

[실시에 11 내지 16 및 비교예 1]

본 실시예는 실시예 1 내지 2에서 수득한 이소임페라토린과 임페라토린이 소정량 함유된 백지 추출물 파우더와 리구스틸라이드가 소정량 함유된 고본 추출물 파우더를 함유한 화장료를 제조하여 사람을 대상으로 피부 미백효과를 비교예 1과 비교실험을 행하여 평가하였다.

비교실험에 사용된 화장료는 크림형태이고, 그 조성은 표 8에 나타낸 바와 같다. 우선 표 8에 기록되어 있는 나)상을 가열하여 70°C에 보온한다. 이것에 가)상을 가하여 예비유화 후 호모믹서로 균일하게 유화하고 다음에 서서히 냉각하여 크림(실시에 11 내지 16, 비교예 1)을 제조한다. 실험자(20세 - 35세의 여성) 20명을 대상으로 얼굴 오른쪽부위에는 실시예 11 내지 16에서 제조된 크림을 얼굴 왼쪽부위에는 비교예 1에서 제조된 크림을 각각 1일 2회씩 연속 2개월간 도포하였다. 실험완료 후 얼굴 좌우 양편의 도포 부위 피부를 화상분석기 및 색차계로 얼굴색을 비교하여 가장 어두운 색을 5, 중간색을 3, 가장 밝은 색을 1로 정하고 그 중간정도를 어림잡아 평가하였다. 표 9는 실시예 13과 16에서 제조된 크림을 사용한 실험자의 안면 피부색을 비교예 1로 만든 크림을 사용한 실험자의 안면 피부색과 비교한 것이다.

표 9에 나타난 바와같이 이소임페라토린과 임페라토린이 소정량 함유된 백지 추출물 파우더와 리구스틸라이드가 소정량 함유된 고본 추출물 파우더를 함유한 크림을 도포한 실험자의 안면 피부에서 미백효과가 우수함을 알 수 있다.

[표 8]

원 료		실 시 예						비교예1
		11	12	13	14	15	16	
가	스테아릴알콜	8	8	8	8	8	8	8
	스테아린산	2	2	2	2	2	2	2
	스테아린산몰레스테르	2	2	2	2	2	2	2
	스쿠알란	4	4	4	4	4	4	4
	2-옥틸도데실알콜	6	6	6	6	6	6	6
	폴리옥시에틸렌(25몰 부가) 알콜에스테르	3	3	3	3	3	3	3
	글리세릴모노스테아린산아스테르	2	2	2	2	2	2	2
나	백지 추출물 파우더	10	1	0.1	-	-	-	-
	고른 추출물 파우더	-	-	-	10	1	0.1	-
	프토티펜글리콜	5	5	5	5	5	5	5
	경계수	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량

주) 단위:중량 %

[표 9]

사용 제품	실시에 13	비교예 1	실시에 16	비교예 1
실험 인원 번호	오른쪽 피부색	왼쪽 피부색	오른쪽 피부색	왼쪽 피부색
1	2	3	1.5	2.5
2	2	3	2	3
3	2.5	3.5	2	3
4	2	3	1.5	3
5	1.5	2.5	2.5	3.5
6	2	3	3	4
7	2.5	3	1.5	2.5
8	3	4	2	3
9	2	3	2	3
10	2	3	2.5	3.5
11	2	3	1.5	3
12	1.5	3	2.5	3
13	2	3.5	2	3
14	1.5	2.5	3	4
15	2.5	3.5	2.5	3
16	2	3	2	3
17	2.5	3	2	3.5
18	3	4	2.5	3
19	2.5	3	2	3
20	2.5	3	2	3

[실시에 17]

본 실시예는 실시예 1 내지 2에서 수득한 이소임페라토린과 임페라토린이 소정량 함유된 백지 추출물 파우더와 리구스 델라이드가 소정량 함유된 고른 추출물 파우더를 함유한 화장료의 자극 완화 효과를 인체 첵포 실험으로 평가한 것이다.

본 평가는 실시예 10에서 얻어진 결과를 인체에 직접 적용하여 얻어진 평가의 결과이다. 일반적 화장품 처방(크림, 로션, 스킨, 에센스)에 자극을 일으키는 SLS와 실시예 11 내지 16에서 제조된 제품을 혼용하여 24시간, 48시간, 72시간 동안 첵포하여 자극 유발 지수를 바탕으로 자극완화 효과를 평가한 것이다.

20-50세의 건강한 남녀 50명의 팔 상박부위에 FINN CHAMBER (FINLAND)를 이용하여 각각의 제품을 0.2mg씩 철폭하고, 24시간 후 급성자극 지수를 평가하였다. 평가 후 제와 동일한 부위에 동량의 제품을 철폭하고 48시간 및 72시간 후의 지연성 자극 지수를 평가하였다.

시험 결과 백지 및 고본 추출물 파우더를 함유하는 제품을 철폭하고 24시간, 48시간, 72시간 경과 후에도 아무런 피부 발적을 일으키지 않았다.

이 평가의 결과는 백지 및 고본 추출물 파우더가 화장료에 혼용되었을 때 자극을 유발시키는 기재(계면활성제, 향, 알콜)에 의한 피부 자극을 감소시킬수 있는 유의한 효과가 있음을 나타낸다.

이하에 그 외의 실시예를 나타내었다. 즉, 앞에서와 같이 미백효과, 자극완화효과, 면역증강효과 등 피부개선에 우수한 효과를 나타내었다.

[실시예 18 내지 실시예 19]

95%에탄올 8g에 폴리피로리돈 0.05g, 올레일알콜 0.1g, 폴리옥시에틸렌노노올레이트 0.2g, 향료 0.2g, 파라옥시안식향산메틸에스테르 0.1g, 소량의 산화방지제, 소량의 색소를 혼합용해 한다. 실시예 1 내지 2에서 수득한 백지, 고본 추출물 파우더 각 0.05g, 글리세린 5g을 정제수 85.33g에 용해한 것에 상기 혼합액을 첨가한 후 교반하여 피부개선효과가 있는 화장수를 얻었다.

[실시예 20 내지 실시예 21]

세틸알콜 1.2g, 스쿠알란 10g, 바세린 2g, 파라옥시안식향산에틸에스테르 0.2g, 글리세린모노에스테아레이트 1g, 폴리옥시에틸렌(20몰부가)모노올레이트 1g 및 향료 0.1g을 70℃에서 가열혼합용해하고, 실시예 1 내지 실시예 2에서 수득한 백지, 고본 추출물 파우더 각 0.5g, 디프로필렌글리콜 5g, 폴리에틸렌글리콜 1500 2g, 트리에탄올아민 0.2g, 정제수 76.2g을 75℃로 가열해서 가열용해시킨다. 양자를 혼합하여 유효시킨 후 냉각하여 수/유중계형의 피부개선효과가 있는 유액을 얻었다.

[실시예 22 내지 실시예 23]

95% 에틸알콜 5g에 폴리옥시에틸렌솔비탄모노올레이트 1.2g, 키토로오즈 0.3g, 히아론산나트륨 0.2g, 비타민 E-아세이트 0.2g, 감초산 나트륨 0.2g, 파라옥시안식향산에틸에스테르 0.1g, 실시예 1 내지 2에서 수득한 백지, 고본 추출물 파우더 각 1g 및 적량의 색소를 혼합하여 피부개선효과가 있는 미용액을 얻었다.

[실시예 24]

[생약 추출물로부터 활성 성분 분리 및 구조 확인]

감압 건조된 액자 에탄올 추출물을 메탄올로 녹인 후 여과하여 1차로 분획화 한 후 2개의 분획을 얻었다(AD-1-A, B). 이 분획들을 감압 농축하여 TLC(thin layer chromatography)를 이용하여 성분 조성을 확인하였다. 전개용매 조건은 헥산(5:5(v/v))으로 하여 TLC를 전개하였다. 2개 분획에 대해 실시예 3 내지 10의 실험을 통해 효과가 확인된 AD-1-A 분획을 칼럼 크로마토그래피를 실시하였다. 동종의 실리카겔에 흡착시킨 시료를 투입한 후 클로로포름으로 용리시켜 안정화시켰다. 그런 다음 클로로포름:메탄올(50:1(v/v))의 전개용매로 용리하였다. 그 후, 최종 물질들이 분리 용출될 때까지 메탄올의 비율을 조금씩 증가시켜 가면서 기울기 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 11개의 분획을 얻었다(AD-2-A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K). 11개의 분획에 대해 실시예 3 내지 실시예 10의 실험을 통해 효과가 확인된 AD-2-C 분획을 칼럼 크로마토그래피를 실시하였다. 전개 용매로 헥산:에틸아세테이트(5:1 내지 3:1)의 비율로 기울기 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 최종적으로 4개의 분획을 얻었다(AD-3-A, B, C, D). 4개의 분획에 대해 실시예 3 내지 실시예 10의 실험을 통해 효과가 확인된 AD-3-B와 D에 대해 TLC를 통해 정성적인 순도 확인 후, IR, UV-VIS 및  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼 분석을 통해 구조를 확인하였다.

분리된 활성 성분의 물리화학적 성질과 여러 가지 분광법을 이용하여 분석한 액자 추출물의 주요 활성 성분의 구조는 다음과 같다.

AD-3-B 분획 물질의 녹는점은  $101-103^\circ\text{C}$ 이었으며, FT-IR (KBr) 측정시 2943, 1725( $\text{C=O}$ ), 1633, 1600, 1580, 1460, 1323, 1207, 1160  $\text{cm}^{-1}$  에서 흡수피크가 나타났다.  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) 분석 결과 8.15(1H, d, 9.74Hz), 7.60(1H, d, 2.53Hz), 7.16(1H, s), 6.96(1H, dd, 0.97Hz, 0.97Hz), 6.27(1H, d, 9.78Hz), 5.54(1H, m), 4.92(2H, d, 6.98Hz), 1.81(3H, s), 1.71(3H, s), 3.85(3H, s)ppm에서 각 피크가 확인되었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) 분석 결과 161.26, 158.12, 152.66, 148.94, 144.87, 139.80, 139.54, 119.09, 114.20, 112.55, 107.52, 105.02, 94.21, 69.74, 25.79, 18.20 ppm에서 흡수피크가 나타났으며, UV-VIS 흡수 스펙트럼 분석결과  $\lambda_{\text{max}}$ 는 200, 249, 307nm 이었다. 이러한 데이터들의 분석을 통해 AD-3-B 분획은 이소임페라토린 (isoimperatorin :  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$ , M.W. 270.28, (10-[(3-메틸-2-부테닐)옥시]-7H-푸로[3,2-g][1]벤조피란-7-온)으로 밝혀졌다.

AD-3-D 분획 물질의 녹는점은  $95-97^\circ\text{C}$ 이었으며, FT-IR(KBr) 측정시 2943, 1720( $\text{C=O}$ ), 1584, 1400, 1150  $\text{cm}^{-1}$  에서 흡수피크가 나타났다.  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) 분석 결과 7.76(1H, d, 9.59Hz), 7.69(1H, d, 2.21Hz), 7.40(1H, s), 6.81(1H, d, 2.21Hz), 6.36(1H, d, 9.58Hz), 5.62(1H, m), 5.01(2H, d, 7.16Hz), 1.73(6H, d, 6.35Hz)ppm에서 각 피크가 확인되었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ )의 경우는 160.49, 148.61, 146.59, 144.31, 143.82, 139.80, 131.66, 125.84, 119.76, 116.48, 114.68, 113.12, 106.68, 70.14, 25.78, 18.09 ppm에서 흡수피크가 나타났으며, UV-VIS 흡수 스펙트럼 분석 결과  $\lambda_{\text{max}}$ 는 217, 247, 298nm 이었다. 이러한 데이터들의 분석을 통해 AD-3-D 분획은 임페라토린(imperatorin :  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$ , M.W. 270.28, (9-[(3-메틸-2-부테닐)옥시]-7H-푸로[3,2-g][1]벤조피란-7-온)으로 밝혀졌다.

감압 건조된 고분 에탄올 추출물을 메탄올로 녹인 후 여과하여 1차로 분획화 한 후 2개의 분획을 얻었다(AT-1-A, B). 이 분획들을 감압 농축하여 TLC(thin layer chromatography)를 이용하여 성분 조성을 확인하였다. 전개용매 조건은 헥산:에틸아세테이트(3:1(v/v))으로 하여 TLC를 전개하였다. 2개 분획에 대해 실시예 3 내지 10의 실험을 통해 효과가 확인된 AT-1-A 분획을 칼럼 크로마토그래피를 실시하였다. 동종의 실리카겔에 흡착시킨 시료를 투입한 후 헥산으로 용리시켜 안정화시켰다. 그런 다음 전개용매를 헥산:에틸아세테이트(5:1 내지 1:1(v/v))의 비율로 하여 용리하였다. 그 후, 최종 물질들이 분리 용출될 때까지 에틸아세테이트의 비율을 조금씩 증가시켜 가면서 기울기 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 11개의 분획을 얻었다(AT-2-A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K). 11개의 분획에 대해 실시예 3 내지 실시예 10의 실험을 통해 효과가 확인된 AT-2-D와 AT-2-I 분획을 얻었다. 2개의 분획 중 AT-2-D 분획은 단일 성분으로 밝혀졌고, 나머지 분획인 AT-2-I 분획을 칼럼 크로마토그래피를 실시하였다. 전개 용매로 클로로포름:메탄올(50:1(v/v))의 비율로 기울기 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 최종적으로 4개의 분획을 얻었다(AT-3-A, B, C, D).



4개의 분획에 대해 실시예 3 내지 실시예 10의 실험을 통해 효과가 확인된 AT-3-A, B 중 AT-3-A는 메탄올로 재결정화하여 AT-4-A 분획을 얻었다. 최종적으로 AT-2-D, AT-3-B, AT-4-A 분획에 대해 TLC를 통해 정성적인 순도 확인 후, IR, UV-VIS 및  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼 분석을 통해 구조를 확인하였다.

분리된 활성 성분의 물리화학적 성질과 여러 가지 분광법을 이용하여 분석한 고본 추출물의 주요 활성 성분의 구조는 다음과 같다.

AT-2-D 분획 물질은 오일 성분으로 녹는점 측정을 실시하지 않았으며, FT-IR(KBr) 측정시 2954, 1765( $\text{C}=\text{O}$ ), 1267  $\text{cm}^{-1}$  에서 흡수피크가 나타났다.  $^1\text{H}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$ ) 분석 결과, 6.28(1H, dt, 1.95Hz, 9.65Hz), 6.00(1H, quintet, 4.24Hz), 5.22(1H, t, 7.80Hz), 2.59(2H, m), 2.48(2H, m), 2.37 (2H, quartet, 7.50Hz), 1.52(2H, sextet, 7.40Hz), 0.94(3H, t, 7.30Hz) ppm에서 각 피크가 확인되었다.

$^{13}\text{C}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$ ) 분석 결과는 167.62, 148.57, 147.05, 129.86, 123.99, 117.11, 112.88, 28.11, 22.40, 18.2, 13.64 ppm에서 흡수피크가 나타났으며, UV-VIS 흡수 스펙트럼 분석결과  $\lambda_{\text{max}}$ 는 204, 271nm 이었다. 이러한 데이터들의 분석을 통해 AT-2-D분획은 리구스틸라이드(ligustilide:  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$ , M.W. 191.54)로 밝혀졌다.

상기 실시예 24는 백지, 고본 추출물의 분획 중 본 발명자들이 요구하는 소정의 효과, 즉 델라노싸이트 자극 호르몬의 세포막 결합저해효과, 티로시나제 활성억제효과, 티로시나제 합성억제효과, 델라닌 합성억제효과 등의 미백효과와 피부 자극완화효과, 피부 면역증강 작용에 우수한 효과를 나타내는 분획만을 골라내는 방법으로 그 활성물질을 추적한 것으로, 이 연구 결과 상기 효과를 나타내는 활성 물질이 이소임페라토린, 임페라토린 및 리구스틸라이드임을 밝힌 점에 의의가 있다.

#### 발명의 효과

이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 백지, 고본 추출물 파우더는 기미, 주근깨 및 피부 색소침착의 원인이 되는 물질인 멜라닌의 생성을 막아주는 델라노싸이트 자극 호르몬(MSH)의 세포막 결합저해효과, 티로시나제 활성억제효과, 티로시나제 합성억제효과, 델라닌 합성억제효과 등의 미백효과와 화장품 기재에 의해 야기되는 피부 자극을 감소시키는 피부세포 사멸억제효과, 염증유발관련효소 활성억제효과 등의 피부자극 완화효과와 면역증강작용에 우수한 효과를 나타내며, 특히 이러한 효과는 함유성분인 이소임페라토린, 임페라토린, 리구스틸라이드에 의한 것임이 밝혀졌다. 따라서, 이러한 백지, 고본 추출물 파우더를 함유하는 화장수, 크림, 유액, 팩 등의 화장료 조성물은 피부 미백효과, 자극완화효과 및 면역증강작용이 있음을 알 수 있다.

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1.

에탄올 40-95중량% 함유 수용액을 추출용매로 추출하여 얻은 것으로서 이소임페라토린과 임페라토린을 각각 0.2-0.4 중량% 포함하는 것을 특징으로 하는 백지 추출물.

##### 청구항 2.

에탄올 40-95중량% 함유 수용액을 추출용매로 추출하여 얻은 것으로서 리구스틸라이드를 0.1-0.3중량% 포함하는 것을 특징으로 하는 고본 추출물.

청구항 3.

- (1) 백지름 70-85℃에서 에탄올 40-95중량% 함유 수용액으로 추출하는 단계와,
- (2) 상기 추출단계에서 얻어진 여액을 50℃이하에서 감압농축하는 단계와,
- (3) 클로로포름과 메탄올(중량%비율 - 50:1 내지 1:1)을 이동상으로 하는 230-400메쉬의 실리카겔 칼럼크로마토그래피에 의해 상기 감압농축물로부터 유효성분인 이소임페라토린과 임페라토린을 함유하는 에탄올 추출물을 분리·정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 백지 추출물의 제조방법.

청구항 4.

- (1) 고본을 70-85℃에서 에탄올 40-95중량% 함유 수용액으로 추출하는 단계와,
- (2) 상기 추출단계에서 얻어진 여액을 50℃이하에서 감압농축하는 단계와,
- (3) 헥산과 에틸아세테이트(중량%비율 5:1 내지 1:1)를 이동상으로 하는 230-400메쉬의 실리카겔 칼럼크로마토그래피에 의해 상기 감압농축물로부터 유효성분인 리구스틸라이드를 함유하는 에탄올 추출물을 분리·정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 고본 추출물 제조방법.

청구항 5.

제1항 또는 제2항 기재의 추출물, 또는 제3항 또는 제4항 기재의 방법에 의해 제조된 추출물을 피막 형성제와 혼합하여 스프레이 드라이로 파우더화한 것을 특징으로 하는 백지 또는 고본 추출물 파우더.

청구항 6.

이소임페라토린, 임페라토린 또는 리구스틸라이드를 유효성분으로 하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 7.

제6항에 있어서, 피부 미백용으로 사용되는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 8.

제6항에 있어서, 피부 자극완화용으로 사용되는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 9.

제6항에 있어서, 피부 면역증강용으로 사용되는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 10.

제6항에 있어서, 상기 유효성분들은 제1항 또는 제2항 기재의 추출물의 형태로 함유되는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 11.

제6항에 있어서, 상기 유효성분들은 제5항 기재의 파우더 형태로 포함되는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.